



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0023372
(43) 공개일자 2009년03월04일

(51) Int. Cl.

G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7029969

(22) 출원일자 2008년12월08일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2008년12월08일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2007/005134

국제출원일자 2007년06월11일

(87) 국제공개번호 WO 2007/141043

국제공개일자 2007년12월13일

(30) 우선권주장

60/812,089 2006년06월09일 미국(US)

60/859,489 2006년11월17일 미국(US)

(71) 출원인

프로테오시스 악티엔게젤샤프트

독일 55129 마인쯔 카를-쾰프-슈트라쎄 51

(72) 발명자

쾰라텐홀츠 안드레

독일 55129 마인쯔 힌터 테어 키르헤 43

(74) 대리인

리엔목특허법인

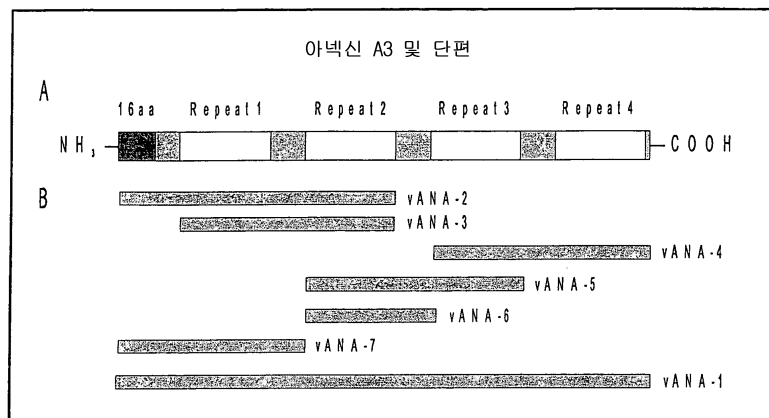
전체 청구항 수 : 총 43 항

(54) 전립선암의 검출을 위한 단일클론 항-아넥신 A3 항체

(57) 요약

본 발명은 높은 특이성의 항체, 특히, 단일클론 항체에 의해, 아넥신 A3, 특히, 세포외 아넥신 A3을 결정하는 단계를 포함하는, 전립선암의 진단 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 그와 같은 항체를 포함하는 테스트 시약에 관한 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

시료에서 다른 아넥신에 대해 낮은 교차반응성을 갖는, 아넥신 A3에 특이적인 항체에 의해 아넥신 A3의 존재 및/또는 양을 분석하는 것인, 암을 진단하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 암은 비뇨생식관 및/또는 위장관의 암인 것인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 암은 상피암인 것인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항에 있어서, 상기 암은 전립선암인 것인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 단일클론 항체인 것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 아넥신 A3의 N-말단, 특히, 인간 아넥신 A3의 아미노산 1 내지 16번의 영역에 있는 에피토프에 대한 것인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 하이브리도마 세포주, tgc 5 ProII6G7(DSM ACC2788), tgc 6 ProIII1G11(DSM ACC2779), tgc 7 ProVII5C5(DSM ACC2780), tgc 8 ProIII1E1(DSM ACC2781), tgc 13 ProI/5G9, tgc 12 ProIII/4B11, tgc 14 ProVIII/3D7에 의해 생성된 항체, 또는 아넥신 A3 상의 동일한 에피토프에 결합하는 항체로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 하기로부터 선택되는 서열을 포함하는 아넥신 A3 상의 에피토프에 대한 것인 방법:

- (i) VRDYPDFSPSVD(서열번호 1);
- (ii) MLISILTERSNA(서열번호 2);
- (iii) GDFRKALLTLADGRRDESLKVDEHLAKQ(서열번호 3);
- (iv) KLTDFEYRNISQKDIVDSIKGELSG(서열번호 4);
- (v) IMVSRSEIDLLDIRTEF(서열번호 5);
- (vi) YSAIKSDTSGDYEITLL(서열번호 6);

또는 6개 이상의 아미노산으로 구성된 길이를 갖는 그들의 부분 연속 서열(partial contiguous sequence).

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 표지화 기(labeling group)를 갖는 것인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 비-침습적(non-invasive) 절차인 것인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 시료는 뇨 시료, 특히, 배출된(exprimate) 뇨 시료인 것인 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 시료는 변 시료인 것인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 조직화학적 절차인 것인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 시료는 조직 시료, 특히, 생검인 것인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외 아넥신 A3의 존재 및/또는 양 및/또는 세포내 아넥신 A3의 존재 및/또는 양이 결정되는 것인 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 추가적인 마커가 결정되는 것인 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 추가적인 마커는 전립선-특이적 항원(PSA) 및/또는 전립선 특이적 막 항원(PSMA)인 것인 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 진단은 병기(disease stage)의 결정을 포함하는 것인 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 적어도 전암기(precancerous stage)와 암기(cancerous stage)의 구별이 수행되는 것인 방법.

청구항 20

다른 아넥신에 대해 낮은 교차반응성을 갖는, 아넥신 A3에 대해 특이적인 하나 이상의 항체를 포함하는 전립선 암의 진단용 테스트 시약.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 항체는 단일클론 항체인 것인 시약.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서, 상기 항체는 아넥신 A3의 N-말단, 특히, 인간 아넥신 A3의 아미노산 1 내지 16번의 영역에 있는 에피토프에 대한 것인 시약.

청구항 23

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 하이브리도마 세포주, tgc 5 ProII6G7(DSM ACC2788), tgc 6 ProIII1G11(DSM ACC2779), tgc 7 ProVII5C5(DSM ACC2780), tgc 8 ProIII1E1(DSM ACC2781), tgc 13 ProI/5G9, tgc 12 ProIII/4B11, tgc 14 ProVIII/3D7에 의해 생성된 항체, 또는 아넥신 A3 상의 동일한 에피토프에 결합하는 항체로부터 선택되는 것인 시약.

청구항 24

제20항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 하기로부터 선택되는 서열을 포함하는 아넥신 A3 상의 에피토프에 대한 것인 시약:

- (i) VRDYPDFSPSVD(서열번호 1);
- (ii) MLISILTERSNA(서열번호 2);
- (iii) GDFRKALLTLADGRRDESLKVDEHLAKQ(서열번호 3);
- (iv) KLTFDEYRNISQKDIVDSIKGELSG(서열번호 4);
- (v) IMVSRSEIDLLDIRTEF(서열번호 5);
- (vi) YSAIKSDTSGDYEITLL(서열번호 6);

또는 6개 이상의 아미노산으로 구성된 길이를 갖는 그들의 부분 연속 서열.

청구항 25

제20항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 표지화 기를 갖는 것인 시약.

청구항 26

암 치료용 약제의 제조를 위한, 다른 아넥신에 대한 낮은 교차반응성을 갖고 아넥신 A3에 대해 특이적인 항체의 용도.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 암은 비뇨생식관 및/또는 위장관의 암인 것인 용도.

청구항 28

제26항 또는 제27항에 있어서, 상기 항체는 키메라 항체 또는 인간화 항체 또는 인간 단일클론 항체인 것인 용도.

청구항 29

제26항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 아넥신 A3의 N-말단, 특히, 인간 아넥신 A3의 아미노산 1 내지 16번의 영역에 있는 에피토프에 대한 것인 용도.

청구항 30

제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 하이브리도마 세포주, tgc 5 ProII6G7(DSM ACC2788), tgc 6 ProIII1G11(DSM ACC2779), tgc 7 ProVII5C5(DSM ACC2780), tgc 8 ProIII1E1(DSM ACC2781), tgc 13 ProI/5G9, tgc 12 ProIII/4B11, tgc 14 ProVIII/3D7에 의해 생성된 항체, 또는 아넥신 A3 상의 동일한 에피토프에 결합하는 항체로부터 선택되는 것인 용도.

청구항 31

제26항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 하기로부터 선택되는 서열을 포함하는 아넥신 A3 상의 에피토프에 대한 것인 용도:

- (i) VRDYPDFSPSVD(서열번호 1);
- (ii) MLISILTERSNA(서열번호 2);
- (iii) GDFRKALLTLADGRRDESLKVDEHLAKQ(서열번호 3);
- (iv) KLTFDEYRNISQKDIVDSIKGELSG(서열번호 4);
- (v) IMVSRSEIDLLDIRTEF(서열번호 5);
- (vi) YSAIKSDTSGDYEITLL(서열번호 6);

또는 6개 이상의 아미노산으로 구성된 길이를 갖는 그들의 부분 연속 서열.

청구항 32

제26항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 효과기 분자(effector molecule)에 접합된 것인 용도.

청구항 33

암 치료용 약제의 제조를 위한, 다른 아넥신에 대해 낮은 교차반응성을 가지며 아넥신 A3에 대해 특이적인 항체를 활성제로 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 34

다른 아넥신에 대해 낮은 교차반응성을 갖는, 아넥신 A3에 대해 특이적인 항체.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 항체는 단일클론 항체인 것인 항체.

청구항 36

제34항 또는 제35항에 있어서, 상기 항체는 아넥신 A3의 N-말단, 특히, 인간 아넥신 A3의 아미노산 1 내지 16번의 영역에 있는 에피토프에 대한 것인 항체.

청구항 37

제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 하이브리도마 세포주, tgc 5 ProII6G7(DSM ACC2788), tgc 6 ProIII1G11(DSM ACC2779), tgc 7 ProVII5C5(DSM ACC2780), tgc 8 ProIII1E1(DSM ACC2781), tgc 13 ProI/5G9, tgc 12 ProIII/4B11, tgc 14 ProVIII/3D7에 의해 생성된 항체, 또는 아넥신 A3 상의 동일한 에피토프에 결합하는 항체로부터 선택되는 것인 항체.

청구항 38

제34항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 하기로부터 선택되는 서열을 포함하는 아넥신 A3 상의 에피토프에 대한 것인 항체:

- (i) VRDYPDFSPSVD(서열번호 1);
- (ii) MLISILTERSNA(서열번호 2);
- (iii) GDFRKALLTLADGRRDESLKVDEHLAKQ(서열번호 3);
- (iv) KLTFDEYRNISQKDIVDSIKGELSG(서열번호 4);
- (v) IMVSRSEIDLLDIRTEF(서열번호 5);
- (vi) YSAIKSDTSGDYEITLL(서열번호 6);

또는 6개 이상의 아미노산으로 구성된 길이를 갖는 그들의 부분 연속 서열.

청구항 39

제34항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 표지화 기 또는 효과기 기(effector group)를 갖는 것인 항체.

청구항 40

제34항 내지 제39항 중 어느 한 항의 항체를 생성하는 세포.

청구항 41

면역화 시약(immunization reagent)의 제조를 위한, 원형의(native) 인간 아넥신 A3의 용도.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 원형의 인간 아넥신 A3은 호중구로부터 분리된 것인 용도.

청구항 43

인간 아넥신 A3에 대한 인간 항체를 제조하는 방법으로서, 인간 시료로부터 상기 항체를 생성할 수 있는 B-세포를 분리하는 단계 및 상기 B-세포 또는 세포, 예를 들면, 그로부터 유래된 하이브리도마 세포로부터 상기 항체를 수득하는 단계를 포함하는 것인 방법.

명세서

기술분야

- <1> 본 발명은 높은 특이성을 갖는 항체, 특히, 단일클론 항체에 의해 아넥신(annexin) A3, 특히 세포외 아넥신 A3을 결정하는 단계를 포함하는 전립선암의 진단 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 그와 같은 항체를 포함하는 테스트 시약에 관한 것이다.

배경기술

- <2> 남성에게, 전립선암은 악성 질환 중 1위를 차지하며, 다른 종양에 비해 중등도의 생물학적 공격도(moderate biological aggressiveness)를 가짐에도 불구하고, 암-유발 사망 중 2위를 차지한다 (Greenlee et al., 2000). 국소적으로 한정된 단계에 대해서는 탁월한 치료 옵션, 즉, 외과적 수술(Huland, 2001a) 및/또는 방사선 요법(Wiegel, 1998)이 있으나, 진행된 단계의 경우에는 호르몬 제거(hormone ablation)의 일시적으로 유효한 방법만이 이용될 수 있다. 호르몬 제거 요법 동안, 통상적으로 2-3년 후 최초 질환의 신규 진행은 호르몬 무반응 상태(hormone refractory state)로 지칭된다. 현재, 호르몬 무반응성 전립선암에 대해서는 완화적 치료 옵션만 존재한다 (Knox & Moore, 2001).
- <3> 결과적으로, 초기 단계에 전립선암을 진단하는 것이 매우 중요하다. PSA(prostate-specific antigen)에 의해, 전립선암의 조기 진단(Stamey et al., 1987) 및 후속 조치(Haese et al., 1999)를 위한 높은 민감도를 갖는 혈청 종양 마커가 이용가능하다.
- <4> PSA는 높은 정도로 기관-특이적이거나, 종양-특이적이지 않기 때문에, 양성 전립선 질환도 상한으로 간주되는 4 ng/ml 범위를 초과하는 PSA의 증가와 연관될 수 있다. 현재 10개 이상의 경직장 방식에 의해 수득된(transrectally obtained) 전립선 편치 생검의 침습적 생성이 이 상황에서 전립선암의 명확한 진단에서 절대 표준이다 (Miller & Weibach, 1999a, b). 그러나, 환자의 최대 25%가 관련된 복잡한 상황을 겪으며, 이는 추가적인 진찰(환자의 13%) 및 입원(해당 환자의 6%)을 필요로 하게 한다 (Lujan et al., 2001; Djavan et al., 2001). 요도 감염의 위험 또는 전립선염의 위험 외에, 출혈 및 수술의 고통이 추가적인 원치않는 발생이고, 이는 일부 기관에서 국소적으로 마취 수단을 수행하는 것에 의해 중화된다 (Irani et al., 1997; Issa et al., 2000; Alavi et al., 2001). 4-10 ng/ml 범위의 PSA 값을 갖는 환자의 약 75%의 경우에서 수행되는 편치 생검은 음성(negative)으로 나타나고, 즉, 양성(benign)의 진단 결과를 보일 것이다(Huland, 2001b). 이미 일부 저자들에게 의해 제안된 바와 같이(Djavan et al., 1999; Okihara et al., 2001), 전립선 편치 생검을 수행하는 것에 대한 징후가 2.5 ng/ml로부터 시작하는 PSA 값으로부터 유래되는 경우, 이 침습적 건강검진 방법은 50 내지 75세 연령의 4명 중 한명에서 예상되어야 할 것이다(Huland, 2001b).
- <5> 따라서, 그의 아형(subform)을 포함한, PSA에 대한 증가된 특이성을 갖는 새로운 마커들(Jung et al., 2001; Makinen et al., 2001)은 침습적 편치 생검을 수행해야 하는 지에 관한 징후를 보다 명확하게 정의하고 따라서 이 검사를 수행해야 하는 환자의 수를 감소시킬 수 있기 때문에, 전립선암의 진단을 위해 매우 높은 관심을 끌고 있다. 따라서, 탁월한 특이성으로, 혈장 또는 배출된 뇨(exprimate urine)과 같은 비-침습적으로 수득된 프로브 물질에 대해서도 적합한 종양 마커가 새로 규명된 아넥신 A3(ANXA3) 마커일 수 있다(Wozny et al., 2006).
- <6> ANXA3은 특정한 인지질에 결합하여 그들의 다양한 효과를 수행하는 Ca^{2+} 효과기 단백질 종류인, 아넥신의 패밀리 의 다소 드문 대표물이다. 그들은 막 표면 상에서 네트워크를 형성할 수 있고, 따라서 단백질과 상호작용하기 위한 막 마이크로도메인(membrane microdomain) 및 동원 포커스(recruiting focus)를 조직할 수 있다(Gerke et al., 2005).
- <7> 아넥신은 그에 의해 세포 분화, 세포 이동 및 또한 면역조절(immunomodulation)에서 중요한 역할을 수행한다. 막 구조 및 막 수송 외에, 또한 아넥신의 막- 및 인지질-독립적 단백질-단백질 상호작용이 있다 (Rescher & Gerke 2004; Gerke & Moss, 2002). 아넥신은 연골 형성 및 골 광화작용(bone mineralization)에 매트릭스 비히

클의 주요한 성분으로 참여한다 (Wang et al., 2003). 전립선 암에서 골형성성 골 전이(osteoblastic bone metastasis) 발생의 비정상적 빈도와 관련하여 ANXA3의 차등적 발현은 특히 흥미롭다(Keller et al., 2001).

<8> ANXA3은 세포내에서 및 세포외에서(Carlson et al., 2004), 예를 들면, 뇨의 엑소솜(exosome)에서 나타난다 (Pisitkun et al., 2004). 엑소솜은 소위 "다소포체(multivesicular body)"의 유도체이고 면역 세포의 항원 제시에서 대안적인, 그러나, 결정적인 역할을 수행할 수 있다 (Schartz et al., 2002). 뇨에서 검출되는 엑소솜은 초기에 이미 기술되었던 소위 프로스타솜(prostosome)과 동일할 수 있고(Arienti et al., 2004; Utleg et al., 2003), 어느 경우든, 양자 모두 ANXA3을 포함한다.

<9> 전립선암 및 기타 비뇨생식관의 상피암의 치료 또는 진단을 위한 단백질 바이오마커가 US 2005 130 876, WO 03 086 461, WO 2005 078 124, EP 05 011 042.8 및 EP 05 026 092.6에 기재된다.

<10> 그러나, ANXA3을 결정하는 이전의 방법들은 다른 아넥신에 대해 상당한 교차반응성(crossreactivity)을 보이는 이용가능한 항원의 낮은 특이성의 문제를 갖는다. 따라서, 본 발명의 목적은 전립선암의 초기 단계에 특이성 높은 진단을 가능하게 하는, 전립선암을 결정하는 방법을 제공하는 것이었다.

발명의 상세한 설명

<11> 제1 양태에서, 본 발명은 시료가 다른 아넥신에 대해 낮은 교차반응성을 갖는, 아넥신 A3에 대한 특이적 항체에 의해 아넥신 A3(ANX A3)의 존재 및/또는 양에 대해 분석되는 것인 암의 진단 방법에 관한 것이다.

<12> 본 발명의 또 다른 양태는 다른 아넥신에 대해 낮은 교차반응성을 갖는, 아넥신 A3에 특이적인 하나 이상의 항체를 포함하는 암 진단용 테스트 시약이다.

<13> 본 발명의 또 다른 양태는 암 치료용 약제의 제조를 위한, 다른 아넥신에 대해 낮은 교차반응성을 갖는, 아넥신 A3에 대한 특이적 항체를 활성제로 포함하는 약제학적 조성물이다.

<14> 본 발명의 또 다른 양태는 다른 아넥신에 대해 낮은 교차반응성을 갖는, 아넥신 A3에 대해 특이적인 항체이다.

<15> 본 발명의 또 다른 양태는 세포, 특히, 전술된 바와 같은 항체를 생성하는 하이브리도마(hybridoma) 세포이다.

<16> 본 출원에서 사용되는 용어, "항체(antibody)"는 또한, Fab 단편 또는 F(ab')₂ 단편과 같은 하나 이상의 항원 결합 도메인을 갖는 항체 단편 또는 단일 사슬 항체(single chain antibody)와 같은 재조합 항체 또는 Fv 단편과 같은 그의 단편을 포괄한다.

<17> 바람직하게는, 항체는 실버 염색 후 웨스턴 블롯의 농도 분석(densitometric analysis)에 의해 결정되는 바와 같이, 아넥신 5, 아넥신 6 및/또는 아넥신 8과 같은 다른 아넥신에 대해 검출가능한 교차반응성을 갖지 않는다. 바람직하게는, 항체는 단일클론 항체 또는 단일클론 항체의 혼합물이다. 단일클론 항체는 또한 키메라 단일클론 항체 또는 비-인간 불변 영역 및 선택적으로 가변 프레임워크 영역을 인간화하는 것에 의해 수득가능한 인간화 단일클론 항체일 수 있다. 그러나, 일부 높은 특이성을 갖는 다중클론 항체정도 본 발명의 방법에 적합하다.

<18> 바람직한 단일클론 항체는 실험 동물, 예를 들면, 마우스, 랫트, 토끼 등을 정제된 ANXA3 또는 그의 단편, 특히, 그의 N-말단 단편으로 면역화시키는 단계 및 표준 방법에 따라 원하는 단일클론 항체를 생성하는 하이브리도마 세포를 수득하는 단계에 의해 수득될 수 있다. 보다 바람직하게는, 인간 아넥신 A3(아넥신 III, 리포코르틴(Lipocortin) III, PAP-III(Placental anticoagulant protein III), 35-알파 칼시메딘(calcimedin), 또는 이노시톨-1,2-시클릭 포스페이트-2-포스포히드롤라아제)의 N-말단 영역, 특히, 인간 아넥신 A3의 아미노산 1-16번 영역(GenBank Accession No. P12429)에 있는 에피토프에 대한 것이다. 바람직하게는, 항체는 암 세포의 표면에 결합한다.

<19> 바람직한 단일클론 항체는 실험 동물, 예를 들면, 마우스, 랫트, 토끼 등을 정제된 ANXA3 또는 그의 단편, 특히, 16개의 N-말단 아미노산을 포함하는 단편, 예를 들면, ANX A3(AA 1-324), ANX A3(AA 1-159) 또는 ANX A3(AA 1-106)과 같은 단편으로 면역화시키는 단계; 및 표준 방법에 따라 단일클론 항체를 생성하는 하이브리도마 세포를 수득하는 단계에 의해 수득될 수 있다. 앞서 설명된 바와 같이, 원하는 특이성을 갖는 단일클론 항체는 에피토프 맵핑 및 ANXA3의 N-말단 부분에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체의 상응하는 선택을 위해 전술된 단편 또는 유사한 단편을 채택하는 스크리닝 절차에 의해 수득될 수 있다. 특히 바람직한 것은 단일클론 항체의 생성을 위한 면역원으로서, 원형의(native) 인간 ANXA3, 예를 들면, 인간 호중구로부터 분리된 인간 ANXA3의 이용이다.

- <20> 또한, ANXA3에 대한 바람직한 단일클론 인간 항체는 개별적인 인간, 예를 들면, 인간 암 환자 또는 기타 개인으로부터 수득될 수 있다. 항체-생성 B-세포들은 표준 방법에 따라 상기 개인들로부터 분리될 수 있다.
- <21> 특히 바람직한 구체예에서, 항체는 하이브리도마 세포주, tgc 5 ProII6G7(DSM ACC2788), tgc 6 ProIII1G11(DSM ACC2779), tgc 7 ProVII5C5(DSM ACC2780), tgc 8 ProIII1E1(DSM ACC2781), tgc 13 ProI/5G9, tgc 12 ProIII/4B11, tgc 14 ProVIII/3D7에 의해 생성된 항체, 또는 아넥신 A3 상의 동일한 에피토프에 결합하는 항체로부터 선택되는 단일클론 항체이다. 동일한 에피토프에 결합하는 항체는 표준 프로토콜에 따른 경쟁 실험에 의해 결정될 수 있다. 전술된 하이브리도마 세포주는 부타페스트 조약에 따라 2006년 5월 5일(DSM ACC2778, DSM ACC2779, DSM ACC2780 및 DSM ACC2781) 및 2007년 6월 5일(tgc 13 ProI/5G9, tgc 12 ProIII/4B11, tgc 14 ProVIII/3D7)에 DMSZ(Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig에 기탁하였다.
- <22> 또 다른 바람직한 구체예에서, 항체는 하기로부터 선택되는 서열을 포함하는 아넥신 A3 상의 에피토프에 대한 단일클론 항체이다:
- <23> (i) VRDYPDFSPSPVD(서열번호 1);
- <24> (ii) MLISILTERSNA(서열번호 2);
- <25> (iii) GDFRKALLTLADGRDESLKVDEHLAKQ(서열번호 3);
- <26> (iv) KLTDFEYRNISQKDIVDSIKGELSG(서열번호 4);
- <27> (v) IMVSRSEIDLLDIRTEF(서열번호 5);
- <28> (vi) YSAIKSDTSGDYEITLL(서열번호 6);
- <29> 또는 6개 이상의 아미노산으로 구성된 길이를 갖는 그들의 연속된 부분 서열.
- <30> 서열번호 1의 특별히 바람직한 부분 서열은 DYPDFSPSPV이다. 서열번호 2의 특별히 바람직한 부분 서열은 LISILTERS이다. 서열번호 3의 특별히 바람직한 부분 서열은 FRKALL 또는 SLKVDEHLA이다. 서열번호 4의 특별히 바람직한 부분 서열은 TFDEYRNIS이다. 서열번호 5의 특별히 바람직한 부분 서열은 SRSEIDLLD이다. 서열번호 6의 특별히 바람직한 부분 서열은 AIKSDTSGDYEI이다. 서열번호 1의 에피토프에 대한 항체의 예는 tgc5 ProVII 5C5(DSM ACC2780)이다. 서열번호 2의 에피토프에 대한 항체의 예는 tgc5 ProII 6G7(DSM ACC2778) 및 tgc6 ProIII 1611(DSM ACC2779)이다. 인간 ANXA3의 C-말단 영역에 있는 에피토프에 대한 항체의 예는 tgc 13 ProI/5G9, tgc 12 ProIII/4B11 및 tgc 14 ProVIII/3D7이다. 특히, 바람직한 항체는 서열번호 5 및/또는 서열번호 6의 에피토프에 대한 것이다.
- <31> 서열번호 1 내지 6의 에피토프에 대한 추가적인 항체는 실험 동물을 에피토프 서열을 포함하는 폴리펩티드 또는 펩티드, 예를 들면, 재조합 인간 ANXA3, 다른 종으로부터의 상동성 폴리펩티드 또는 그의 단편에 의해 면역화시키는 단계에 의해 수득될 수 있다.
- <32> 본 발명에 따라 진단될 수 있는 암은 바람직하게는 전립선암, 방광암, 신장암, 요도암, 난소암, 자궁암 또는 결장암과 같은 비호생식관 및/또는 위장관의 암이다. 특히, 상기 암은 상피암이다. 특히 바람직한 구체예에서, 상기 암은 전립선암이다.
- <33> 본 발명의 방법은 면역학적 결정을 위해 적합한 임의의 테스트 포맷에 의해 수행될 수 있다. 일부 테스트 포맷에서, 표지화 기(labeling group), 예를 들면, 라텍스 또는 골드 비드와 같은 시각적 마커, 형광 마커 기, 효소 마커 기 등을 갖는 항체를 이용하는 것이 바람직할 수 있다. 항체와 표지화 기의 컨주게이트(conjugate)는 표준 방법, 예를 들면, 카르복시, 아미노 및/또는 티올기와 같은 항체의 반응성 아미노산 결사슬과 표지화 기를 예를 들면, 이관능성 스페이서 분자(bifunctional spacer molecule)를 통해 공유결합시키는 것에 의해 생성될 수 있다.
- <34> 시료는 바람직하게는 인간 개체로부터 수득된다. 특히 바람직한 구체예에서, 본 발명의 방법은 시료가 예를 들면, 뇨 시료, 특히, 배출된(exprimate) 뇨 시료 또는 변 시료일 수 있는 것인 비-침습적 진단 절차이다. 바람직한 경우, 시료는 전처리 절차, 예를 들면, 겔 여과를 거칠 수 있다.
- <35> 시료는 세포외 및 세포내 ANXA3의 개별적인 결정을 가능하게 하는 분획화(fractionation) 절차를 거칠 수 있다. 예를 들면, 시료는 세포 펠릿 및 상층액을 수득하기 위해 원심분리될 수 있고, 그에 의해 세포내 아넥신 A3은

세포 펠릿에서 결정되고, 세포의 아넥신 A3은 상층액에서 결정될 수 있다. 특히 바람직한 구체예에서, 본 발명의 방법은 세포의 ANXA3의 선택적 결정을 포함할 수 있다.

- <36> 추가적인 구체예에서, 본 발명의 방법은 시료가 조직 시료, 특히, 생검, 예를 들면, 펀치 생검일 수 있는 것인 조직화학적 절차일 수 있다. 조직화학적 절차에서, 세포의 ANXA3의 선택적 결정은 시료 내에서 ANXA3의 국소화(localizaiton)를 결정하는 것에 의해 수행될 수 있다.
- <37> 본 발명의 방법에서, 시료는 전립선 비대증(BPH), 섬유증, 만성 전립선염, 다양한 단계의 전립선 상피내 종양(PIN1-3)의 다양한 상태를 갖는 비-암(non-cancer) 환자와 비교하여, 세포의 ANXA3의 양(abundance)이 시료의 상층액, 예를 들면, 저속 원심분리 후의 배출된 뇨 또는 상응하는 펠릿에서 감소된 경우, 암, 예를 들면, 전립선암을 표시하는 것으로 분류될 수 있다. 완전히 건강한 환자와 비교하여, ANXA3의 양은 펠릿 및 상층액 모두에서 증가된 것으로 보일 수 있다. 모두를 고려하여, 전술된 다양한 상태의 진단적 구별을 위해 이용되는, 배출된 뇨의 상층액 및/또는 펠릿에서 ANXA3의 총 양 또는 농도의 임의의 유형의 비 또는 조합은 본 발명에 의해 포함된다.
- <38> 본 발명은 필수적으로 진단 목적을 위한 임의의 유형의 차등적 원심분리 및 관련된 비에 의해 접근가능한, 예를 들면, 배출된 뇨의 다양한 세포내 및 세포의 시료 분획에서 ANXA3 양과 관련된 일련의 컷-오프(cut-off)를 포함한다.
- <39> 본 발명의 방법은 추가적인 암 마커, 예를 들면, 암 마커의 결정을 더 포함할 수 있다. 추가적인 마커의 결정은 ANXA3이 결정되는 동일한 시료, 또는 상이한 시료, 예를 들면, 혈액, 혈청 및/또는 혈장 시료에서 수행될 수 있다. 특히 바람직한 것은 혈액, 혈청 또는 혈장 마커, 특히, 전립선 특이적 항원(PSA)과 같은 칼리크라인 프로테아제(kallikrein protease) 패밀리의 하나 이상의 구성물 및/또는 하나 이상의 상피 세포 마커, 특히, 전립선 특이적 막 항원(PSMA)의 결정이다.
- <40> 본 발명의 진단 방법은 PIN과 같은 전암기(precancerous stage)와 암 질환 기간의 구별이 수행되는 것인 병기(disease stage)의 결정을 포함할 수 있다. 병기의 결정은 임상 병리학자에 의한 조직학적 분류에 기초하며, 전립선암의 표준 분류는 Gleason score에 따르나, 암을 증가하는 중증도(severity)의 세 개의 그룹으로 그룹핑하는 다른 병기결정 방법(staging method)들이 있다. 현재까지, 이와 같은 병기결정 방법은 형태학적 기준에 크게 의존하며, 숙련된 전문가를 필요로 한다. 비-암(non-cancer) 케이스의 경우, 전립선 비대증(BPH), 섬유증, 만성 전립선염, 다양한 단계의 전립선 상피내 종양(PIN1-3)의 전술된 상태들이 기재되었다. 본 발명은 배출된 뇨 또는 다른 시료의 임의의 유형의 분획으로부터의 적합한 세트의 컷-오프에 의한 ANXA3-관련 판독(read-out)을 이용하는 것에 의한 전립선암 또는 전립선-관련 비-암 병기(non-cancerous stage)의 임의의 유형의 층화(stratification)에 관한 것이다.
- <41> 본 발명은 또한 약제학적 응용, 예를 들면, 암, 특히, 전술된 바와 같은 비뇨생식관 및/또는 위장관의 암, 보다 특별하게는 전립선암의 치료를 위한 약제의 제조를 위한 응용에서 전술된 항체의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 이 구체예에서, 항체는 바람직하게는 불변 인간 영역, 예를 들면, 불변 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 영역 및 선택적으로 인간화된 프레임워크 영역(framework region)을 갖는 키메라 항체 또는 인간화 단일클론 항체이다. 대안적으로, 항체는 인간 개체의 혈청으로부터 수득될 수 있는 인간 항체일 수 있다. 치료 항체는 바람직하게는 암세포, 예를 들면, 전립선 암세포의 표면에 결합한다.
- <42> 치료 항체는 효능기 분자(effector molecule), 예를 들면, 방사성 모이어티(moiety) 및/또는 세포독성(cytotoxic) 모이어티에 접합될 수 있다. 치료적 응용을 위해, 항체는 질병의 유형 및 중증도에 따라, 주입에 의해, 예를 들면, 1일 10 내지 5000 μ g의 치료적 유효량으로 투여되거나 바람직하게는 1일 4000 내지 1000 μ g의 치료적 유효량으로 투여될 수 있다. 항체는 공지된 방법에 의해, 예를 들면, 트라스투주마브(Trastuzumab), 리톡시마브(Rituximab), 세톡시마브(Cetuximab) 등과 같은 다른 항체의 투여를 위해 알려진 표준 프로토콜에 따라 비경구로 투여될 수 있다. 항체의 투여는 다른 치료적 옵션, 예를 들면, 다른 항-종양 항체의 투여, 세포독성제의 투여, 외과적 수술 및/또는 방사선 치료법과 조합될 수 있다.
- <43> 또한, 본 발명은 하기의 도면 및 실시예에 의해 보다 상세하게 설명될 것이다.

실시예

- <60> 실시예 1
- <61> 인간 아넥신 A3, vANA-5(AA 107-243), vANA-7(AA 1-106), vANA-1(AA 1-324), vANA-2(AA 1-159), vANA-3(AA

35-159), vANA-4(AA 191-324) 및 vANA-6(AA 107-190)의 재조합 가용성 단편들을 클로닝하고 대장균에서 발현시키고, 뒤이어 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 아넥신 A3 및 그의 재조합 단편의 구조의 개요가 도 1에 도시된다.

<62> 도 2, 3 및 4는 표준 크로마토그래피 절차에 의해 정제된 재조합 가용성 ANXA3 단편, vANA-5, vANA-7 및 vANA-1의 쿠마시-염색된(Coomasie-stained) 1D 겔을 보여준다.

<63> 융합 후 및 항체-생성 세포의 클로닝 동안 양성 하이브리도마 세포에 대한 스크리닝인, 단편 vANA-1에 기반한 항-아넥신 A3 ELISA를 개발하였다(도 5). ANXA3의 원형의 에피토프에 결합하는 항체의 포괄적인 인식을 달성하기 위해, ELISA 플레이트로의 결합 전에 재조합 vANA-1을 복원(renature)시켰다. 재조합 vANA-1을 1 μ g/웰의 농도로 ELISA 플레이트에 코팅시켰다. ELISA 플레이트의 관능성(functionality)을 다중클론 항 ANXA3 혈청으로 확인하였다.

<64> 도 6은 전립선 조직의 양성 시료 및 암 시료에 대한 다중클론 혈청의 반응성의 위 스펙트럼 컬러 표현(false spectral colour depiction)을 보여준다. 암 시료는 2D-PAGE에 의해 블롯팅된 상태로 도시된다. 신호의 대부분은 질량 분석법에 의해 ANXA3으로 확인된, 네 개의 스팟의 사슬로부터 획득된다. 이 위 스펙트럼 컬러 이미지는 단색 그레이스케일에 의해 허용되는 것보다 훨씬 더 깊은 동적인 범위를 반영한다. 비-ANXA3 신호의 강도는 항상 배경에 가깝고, 이는 청색(배경에 가까움) 픽셀에 의해 표현된다. 특이적 신호와 비-특이적 신호 간의 이 대조의 정도는 단색 그레이스케일로 결과를 표시하는 도 6의 라인 8 및 9에 표시된다.

<65> 이 상황은 단일클론 항체 tgc5 Pro II6G7 = DSM ACC2778(라인 10 및 11); tgc6 ProIII1G11(DSM ACC2779)(라인 15 및 16); tgc7 ProVII5C5 (DSM ACC2780)(라인 12-14); tgc8 ProIII1E1 (DSM ACC2781)(라인 17-19)의 다양한 희석액의 라인 10 내지 19의 신호 프로파일에 의해 특히 강조된다;이는 훨씬 더 낮은 교차 반응성을 보여준다.

<66> 도 6에 도시된 바와 같이, 본 발명의 대상인 단일클론 항체는 본질적으로 다른 아넥신과의 교차-반응성을 갖지 않는다. Wozny et al., 2006으로부터의 다중클론 혈청은 ANXA6과 약간의 잔류 교차-반응성을 가지나, 도 6의 우측 상에 도시된 (전립선암 환자로부터의 생검 및 전립선암 세포주, PC3) 단일클론 항체에 의한 염색은 ANXA3에 대한 33kD이 아닌 다른 위치에서 1% 미만의 배경 염색을 생성했다.

<67> 도 7은 ECL(Electrochemiluminescence) 현상 후 항-ANXA3 염색의 농도계에 의한 정량을 보여준다. PC3 세포로부터의 전체 세포 용해액의 웨스턴 블롯을 항체 tgc7 ProVII5C5(DSM 2780)에 의해 분석하였다. ANXA3에 상응하는 단 하나의 밴드만이 확인되었다. 실질적으로 교차반응성이 없었다.

<68> 실시예 2

<69> 배출된(exprimate) 뇨 시료 및 조직 절편에서 항체 특이성의 결정

<70> 암 환자로부터 배출된 뇨로부터 획득된 상층액에서 ANXA3을 검출하기 위해 전술된 바와 같은 ELISA 포맷에서 실시예 1의 단일클론 항체를 이용하였다.

<71> 도 8에 도시된 바와 같이, 보정을 위해, ELISA-플레이트를 tgc7 ProVII5C5(DSM ACC2780)로 코팅하고, 비오틴화된 tgc5 Pro II6G7(DSM ACC2778) 및 아비딘-HRP를 이용하고 TMB를 기질로 하여, 일련의 희석된 vANA-1(20-0.3 ng/웰)을 검출하였다. 효소에 의한 발색 반응은 표시된 바와 같이, 15분, 30분 및 45분 후에 중단시켰다.

<72> 도 9에, 환자로부터 채취된 배출된 뇨의 상층액에서 ANXA3의 검출이 도시된다. 시료를 표준 임상 절차에 따라 저속 원심분리에 의해 원심분리시켰다. 1D PAGE로부터 웨스턴 블롯을 방해할 수 있는 우레아를 본질적으로 제거하는, 사전 겔 여과(GF)에 의해 신호를 개선시켰다.

<73> 또한 조직 절편의 면역조직학적 염색에서 항체를 테스트하였다. 정상 전립선 상피에서 ANXA3의 높은 세포내 농도가 관찰되었다. PIN으로부터 암으로의 질병의 진행 동안 세포외에 국소화된 ANXA3의 명백한 국소적(apparant local) 증가가 관찰되었다. 그러나, 생검의 이 염색된 영역들은 배출된 뇨의 상층액과 펠릿 간의 진단적 ANXA3의 분포의 정량적 관계의 일반적인 추정을 나타내거나 또는 허용하지 않는다. 이는 생검은 다소 정성적이나, 양성 특성의 암의 전립선 영역(prostate areas of cancerous of benign quality)을 포괄적으로 나타낼 수 없기 때문이다.

<74> 실시예 3

<75> 배출된 뇨 시료에서 ANXA3의 결정을 위한 임상 연구

- <76> 채액, 특히, 배출된 뇨에서 ANXA3의 비-침습적 검출에 기반한 전립선암 진단의 민감도 및 특이성을 결정하기 위해 다기관 공동 맹검 임상 연구(multicentre blinded clinical study)를 수행하였다.
- <77> 3.1 환자 및 대조군
- <78> A: 조직학적으로 확인된 전립선암을 갖는 환자(PCA군): n = 약 200.
- <79> B: 조직학적 테스트에 의해 결정된 전립선암을 갖지 않는 환자(대조군): n = 약 300.
- <80> 3.2 시료 채취 및 처리
- <81> 3.2.1 혈청/혈장
- <82> 혈청 PSA 값의 통상적인 결정을 위한 혈청 튜브를 정맥내로 채취하였다. 또한, 1-2 ml의 혈청을 추가적으로 채취하여 급속-냉동 상태로 보관하였다. 이 혈액 시료를 PSA에 대해 더 분석하였다. 혈액 시료의 채취는 전립선 편지 생검 또는 직장내촉진(rectal palpation)을 수행하기 전에 이루어졌다.
- <83> 3.2.2 배출된 뇨의 침전
- <84> 전립선의 20s 촉진 및 마사지 후에, 환자에게 방광을 비우도록 요구했다. 수득된 배출된 뇨를 공표된 절차에 따라 처리하고(I. Rehman, A. R. Azzouzi, J. W. F. Catto, S. Allen, S. S. Cross, K. Feeley, M. Meuth, & F. C. Hamdy, Proteomic analysis of voided urine after prostatic massage from patients with prostate cancer: A pilot study, Urology 64(6), 2004, 1238-1243; C. Goessl. M. Muller, R. Heicappell, H. Krause, B. Straub, M. Schrader & K. Miller, DNA-based detection of prostate cancer in urine after prostatic massage. Urology 58(3), 2001, 335-338) 생성물은 -80℃에 보관하였다.
- <85> 혈청과 같이, 배출된 뇨는 가능한 한, 전립선 편지 생검이 수행되기 전에 채취되어야 했다.
- <86> 3.3 결과
- <87> 약 200명의 PSA 양성 환자에서, 배출된 뇨 시료의 침전물 및 상층액에서 ANXA3의 결정은 약 90%의 민감도 및 약 80%의 특이성을 보였다.
- <88> 도 10에 도시된 바와 같이, 2-6 ng/ml 범위의 PSA를 갖는 환자에서 상층액(u.anx.tot) 내의 ANXA3에 기반한 판독물에 대한 ROC-값은 0.8이었고, 4-10 ng/ml의 PSA-값의 범위에서, ROC 값은 0.85이고, 모든 환자 및 모든 범위의 PSA 값에 대한 전체 집계의 경우, ANXA3에 대한 ROC-값은 0.74였다.
- <89> 4 내지 10 ng/ml의 PSA 값을 갖는 환자들에 대한, 도 10의 대표적인 ROC 곡선은 특히, PSA에 대한 이 중요한 그레이 영역(PSA의 특이성이 매우 낮음)에서 진단적 중요성을 보여준다(Roddam AW, Duffy MJ, Hamdy FC, Ward AM, Patnick J, Price CP Rimmer J, Sturgeon C, White P, Allen NE; On behalf of NHS Prostate Cancer Risk Management Programme. Use of prostate-specific antigen(PSA) isoforms for the detection of prostate cancer in men with a PSA level of 2-10 ng/ml; systematic review and meta-analysis. Eur Urol. 2005 Sep; 48(3): 386-99; discussion 398-9. Review. PMID: 15982797; Stamey TA, Caldwell M, McNeal JE, Nolley R, Hemenez M, Downs J. The prostate specific antigen era in the United States is over for prostate cancer: what happened in the last 20 years? J. Urol. 2004 Oct; 172(4 Pt 1): 1297-301. PMID: 15371827)). ROC 곡선은 임상 통계학의 표준 도구이며, 예를 들면, <http://www.anaesthetist.com/mnm/stats/roc/>에 잘 설명되어 있다.
- <90>
- <91> 실시예 4
- <92> 단일클론 항체의 암 세포로의 결합
- <93> 단일클론 항-ANXA3 항체는 진단(병리 조직학) 및 치료적 응용에서 표면 마커로서 적합하다.
- <94> 유동 세포측정법(flow cytometry)에 의해 하기에 표시된 바와 같이, 특히, N-말단 에피토프에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체, tgc7 ProVII5C5(DSM ACC2780)는 칼슘-의존적 방식으로 전립선암 세포주(PC-3 세포, ATCC, DCV-1017, Version 08-2004)의 세포외 결합 부위에 결합한다.
- <95> 각 실험 동안 이차 항체와의 단독 인큐베이션에 의해서 및 비특이적이고 관련되지 않은 대조구 항체(단일클론

및 다중클론 항체)를 이용하여 비특이적 결합을 평가하였다.

- <96> 도 11은 Wozny et al., 2006에서 사용된 다중클론 혈청(도 6 참조)은 PC-3 세포의 표면에 유의성 없는 수준으로만 결합한다는 것을 보여준다.
- <97> 세포를 적합한 완충액으로 세정하고 도 11에 표시된 희석 농도로 30분간 얼음 상에서 인큐베이션시켰다. 뒤이어, 모든 시료들을 FITC-결합된 항-토끼 이차 항체의 1:50 희석액 100 μ l와 인큐베이션시켰다. 세척 단계 후에, 각 시료의 12,000개의 세포들을 표시된 바와 같이 유동 세포측정법에 의해 분석하였다.
- <98> 본질적으로, 다중클론 혈청은 다양한 희석 농도에서 대조구 혈청에 비해 형광 강도의 유의성 있는 증가를 초래하지 않았다. 따라서, PC-3 세포 상에서 ANXA3의 표면 발현은 이 단계에서 관찰될 수 없으며, 이는 아마도 다중클론 혈청 내의 특이적 항체의 농도가 너무 낮기 때문이다.
- <99> 그러나, 도 12에 표시된 바와 같이, 단일클론 항체 tgc7 ProVII5C5(DSM ACC2780)은 실제로 PC-3 세포의 표면 에피토프에 농도- 및 칼슘-의존적 방식으로 결합한다.
- <100> 실시예 5
- <101> 에피토프 맵핑
- <102> 아넥신 A3(ANXA3)의 전체 항원성 영역을 뒤덮는 중첩된 펩티드 서열을 이용한 후에, 본 발명자들은 높은 특이성의 다중클론 항체의 결합을 분석하는 것에 의해(도 1 참조) 도 13 및 14에 표시된 바와 같이 6개의 에피토프만이 높은 특이성 결합을 담당한다는 결론에 도달했다. 다중클론 항혈청의 특이성은 2D-PAGE-유래 웨스턴 블롯 및 질량 분석법에 의해 제어되었다. 동일한 절차를 단일클론 항체 tgc5 Pro II6G7 = DSM ACC2778; tgc6 ProIII1G11 = DSM ACC2779; tgc7 ProVII5C5 = DSM ACC2780; tgc 13 ProI/5G9; tgc 12 ProIII/4B11; tgc 14 ProVIII/3D7에 적용하였다.
- <103> 에피토프 맵핑은 ANXA3의 N-말단 영역에 있는 두 개의 에피토프 외에, 또한 ANXA3의 중간 영역에 있는 2개의 에피토프 및 ANXA3의 C-말단 영역에 있는 2개의 에피토프로부터의 기여가 있다는 것을 보여주었다(도 13).
- <104> 인간 ANXA3 상에 있는 이 에피토프들(에피토프 1-6으로 지정됨)의 위치가 도 14에 도시된다.
- <105> 도 14에 개략적으로 표시된 인간 ANXA3의 결정 구조(<http://www.pdb.org/pdb/files/laxn.pdb> 및 <http://www.pdb.org/pdb/explore/do?structureId=1AXN>)은 에피토프 1, 2, 5 및 6이 ANXA3의 원형 폴드(native fold)의 도메인을 형성한다는 것을 의미한다. 따라서, 본 발명자들은 상응하는 항체를 수득하기 위해 호중구로부터 인간 ANXA3을 분리하고 이 물질로 토끼를 면역화시켰다. 이 항체들은 원형의 ANXA3에 대한 것이고, 본 발명자들은 다시 가장 높은 특이성에 대해 스크리닝하고 선택하였고 상응하는 에피토프 1, 2, 5 및 6을 포함하는 도메인에 결합하는 항체가 진단 및 치료적 목적에 특히 적합했다.

<106>

참조문헌

1. **Alavi AS**, Soloway MS, Vaidya A, Lynne CM, Gheiler EL. Local anesthesia for ultrasound guided prostate biopsy: a prospective randomized trial comparing 2 methods. J Urol 2001; 166: 1343-1345.
2. **Arienti G**, Carlini E, Saccardi C, Palmerini CA. Role of human prostasomes in the activation of spermatozoa. J Cell Mol Med. 2004 Jan-Mar;8(1):77-84.
3. **Carlsson** et al. Dominant prostatic immunogens for sperm-agglutinating autoantibodies of infertile men. J Androl. 2004; 25:699-705.
4. **Djavan B**, Zlotta A, Kratzik C, Remzi M, Seitz C, Schulman CC, Marberger M. PSA, PSA density, PSA density of transition zone, free/total PSA ratio, and PSA velocity for early detection of prostate cancer in men with serum PSA 2.5 to 4.0 ng/mL. Urology 1999; 54: 517-522.
5. **Djavan B**, Waldert M, Zlotta A, Dobronski P, Seitz C, Remzi M, Borkowski A, Schulman C, Marberger M. Safety and morbidity of first and repeat transrectal ultrasound guided prostate needle biopsies: results of a prospective european prostate cancer detection study. J Urol 2001; 166: 856-860.
6. **Gerke V**, Creutz CE, Moss SE. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005 Jun;6(6):449-61.
7. **Gerke V**, Moss SE. Annexins: from structure to function. Physiol Rev. 2002 Apr;82(2):331-71.
8. **Greenlee RT**, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics. CA

<107>

Cancer J 2000; 50: 7-33.

9. **Haese A**, Huland E, Graefen M, Hammerer P, Noldus J, Huland H. Ultrasensitive detection of prostate specific antigen in the followup of 422 patients after radical prostatectomy. J Urol 1999;161: 1206-1211.
10. **Huland H**. Radical prostatectomy: options and issues. Eur Urol 2001a; 39 Suppl 1: 3-9.
11. **Huland H**. Editorial. J Urol 2001b.
12. **Knox JJ, Moore MJ**. Treatment of hormone refractory prostate cancer. Semin Urol Oncol 2001; 19: 202-211.
13. **Irani J**, Fournier F, Bon D, Gremmo E, Dore B, Aubert J. Patient tolerance of transrectal ultrasound-guided biopsy of the prostate. Br J Urol 1997; 79: 608-610.
14. **Issa JP**: CpG-island methylation in aging and cancer. Curr Top Microbiol Immunol 2000; 249: 101-118.
15. **Issa MM**, Bux S, Chun T, Petros JA, Labadia AJ, Anastasia K, Miller LE, Marshall FF. A randomized prospective trial of intrarectal lidocaine for pain control during transrectal prostate biopsy: The Emory University experience. J Urol 2000; 164: 397-399.
16. **Jung K**, Stephan C, Elgeti U, Lein M, Brux B, Kristiansen G, Rudolph B, Hauptmann S, Schnorr D, Loening SA, Sinha P. Molecular forms of prostate-specific antigen in serum with concentrations of total prostate-specific antigen <4 microg/L: are they useful tools for early detection and screening of prostate cancer? Int J Cancer 2001; 93: 759-765.
17. **Keller, E.T.** et al., Prostate Karzinoma skeletal metastases: cross-talk

between tumor and bone. *Cancer Metastasis Rev.* 20, 333-349. (2001).

18. **Lujan GM**, Paez BA, Gonzalez FI, Romero CI, Gomez de Vicente JM, Berenguer SA. Adverse effects of transrectal prostatic biopsy. Analysis of 303 procedures. *Actas Urol Esp* 2001; 25: 46-49.
19. **Makinen T**, Tammela TL, Hakama M, Stenman UH, Rannikko S, Aro J, Juusela H, Maattanen L, Auvinen A. Prostate cancer screening within a prostate specific antigen range of 3 to 3.9 ng./ml.: a comparison of digital rectal examination and free prostate specific antigen as supplemental screening tests. *J Urol* 2001; 166: 1339-1342.
20. **Miller K**, Weißbach L (Hrsg.): Leitlinien zur Diagnostik von Prostatakarzinomen. *Urologe A* 1999 a; 38: 388-401.
21. **Miller K**, Weißbach L (Hrsg.): Leitlinien zur Diagnostik von Prostatakarzinomen. *Urologe A* 1999 b; 38: 630-639.
22. **Okihara K**, Fritsche HA, Ayala A, Johnston DA, Allard WJ, Babaian RJ. Can complexed prostate specific antigen and prostatic volume enhance prostate cancer detection in men with total prostate specific antigen between 2.5 and 4.0 ng./ml. *J Urol* 2001; 165: 1930-1936.
23. **Pitsitkun T**, Shen R-F, Knepper MA . Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *PNAS* 2004; 101: 13386-13373.
24. **Rescher U**, Gerke V. Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci.* 2004 Jun 1;117(Pt 13):2631-9.
25. **Schartz, N.E.**, Chaput, N., Andre, F. & Zitvogel, L. From the antigen-presenting cell to the antigen-presenting vesicle: the exosomes. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 4, 372-381 (2002).

26. **Stamey TA**, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. N Engl J Med 1987; 317: 909-916.
27. **Wang, W.**, Xu, J. & Kirsch, T. Annexin-mediated Ca^{2+} influx regulates growth plate chondrocyte maturation and apoptosis. J. Biol. Chem. 278, 3762-3769. (2003)
28. **Utlei AG**, Yi EC, Xie T, Shannon P, White JT, Goodlett DR, Hood L, Lin B. Proteomic analysis of human prostasomes. Prostate. 2003 Jul 1;56 (2):150-61.
29. **Wiegel T**: Welchen Stellenwert hat die Strahlentherapie in der Therapie des Prostatakarzinoms? Urologe B 1998; 38 (suppl 1): 58-64.
30. **Wozny W**, Schroer K, Schwall G, Stegmann W, Dietz K, Rogatsch H, Huebl H, Klocker H, Schrattenholz A, Cahill MA. Quantitative differential radioactive analysis of protein expression in human prostate cancers reveals novel biomarkers. 2006.

도면의 간단한 설명

- <44> 도 1: 단일클론 항체의 에피토프 매핑을 위해 이용된 아넥신 A3(A) 및 아넥신 A3의 재조합 단편의 구조의 개요; 에피토프 매핑에 의한 이와 같은 유형의 스크리닝에 근거하여, 본 특허출원의 대상인 단일클론 항체를 선택하였다.
- <45> 도 2: 인간 아넥신 A3 단편 vANA-5(아미노산 107-243)의 정제; SDS-PAGE 크로마토그래피에 의해 정제된 vANA-5.
- <46> 도 3: 인간 아넥신 A3 단편 vANA-7(아미노산 1-106)의 정제; SDS-PAGE 크로마토그래피에 의해 정제된 vANA-7.
- <47> 도 4: 인간 아넥신 A3 단편 vANA-1(아미노산 1-324)의 정제; SDS-PAGE 크로마토그래피에 의해 정제된 vANA-1.
- <48> 도 5: vANA-1 ELISA 플레이트의 테스트; 퍼플: 아넥신 A3-특이적 항혈청; 블루: 무표지 혈청(null serum); 토끼로부터의 프리미엄 혈청(premium serum).
- <49> 도 6: 항-ANXA3 항체의 특이성: 라인 1-9 및 2D- 웨스턴 블롯은 Wozny et al., 2006으로부터 유래하였다; 라인 10-19는 본문에서 설명된 바와 같이 다양한 단일클론 항-ANXA3 항체를 보여준다. 그들은 다른 아넥신의 단백질에 대해 실질적으로 교차-반응성을 보이지 않는다.
- <50> 도 7: PC3 세포로부터의 전체 세포 용해액의 웨스턴 블롯의 ECL 현상(development) 후 항-ANXA3-염색의 농도계에 의한 정량(densitometric quantification)은 단일클론 항체 tgc7 ProVII5C5(DSM ACC2780)의 높은 특이성을 보여준다.
- <51> 도 8: 항원인 vANA-1에 의한 항-ANXA3-기반 ELISA의 보정, 발색 반응은 15(A), 30(B) 및 45(C)분 후에 중단시켰다.
- <52> 도 9: 표준 저속 원심분리 후 배출된 노 상층액에서 ANXA3의 검출; A, D: 15분 현상; B,E: 30분 현상; 및 C, F: 45분 현상; 펄크 곡선은 우레아를 제거하기 위한 겔 여과(GF) 후에 획득되었다.
- <53> 도 10: 도 6에 도시된 바와 같은 ELISA를 이용하고 4-10 ng/ml 범위의 PSA-값을 갖는 200명의 환자에 기반한 항-ANXA3-기반 진단 연구의 ROC 곡선; AUROC는 0.823으로, PSA "그레이 영역(grey zone)" 전체에 대해 주용한 지표에 대해 70% 민감도에서 90% 특이성을 나타낸다.
- <54> 도 11: Wozny et al., 2006(도 1 참조)에서 사용된 다중클론 혈청은 PC-3 세포의 표면에는 유의성없는 정도로만 결합한다.
- <55> 도 12: tgc7 ProVII5C5(DSM ACC2780)에 의한 PC-3 세포 상의 표면-ANXA3의 검출; 항체는 그래프에 표시된 농도

로 사용되었다. 이차 항체로서, 1:50의 희석비로 항-마우스-IgG-FITC를 이용하고, 염색 부피는 항체 희석액 100 μ l였다.

<56> 이 결과들은 잠재적으로 치료적으로 이용될 수 있는 이 전립선암 세포주에서 ANXA3의 표면 국소화를 보여준다.

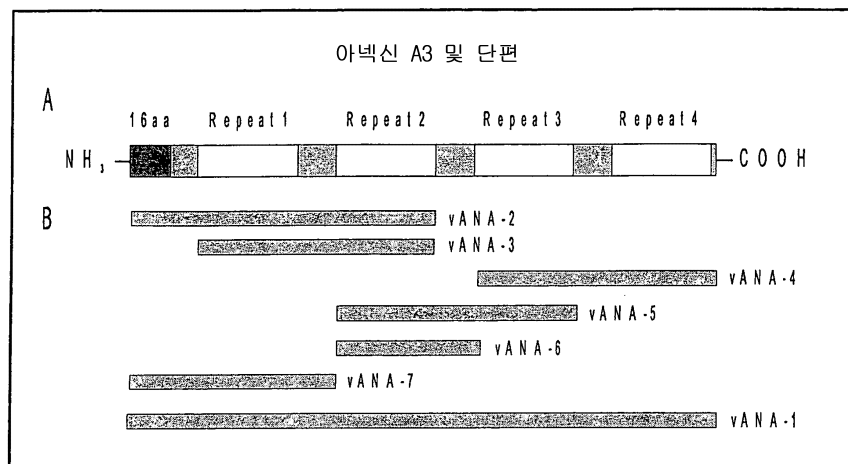
<57> 도 13: ANXA3의 항원 영역을 뒤덮는 중첩된 펩티드 서열을 이용하여, 6개의 에피토프를 발견하고 다중클론 항혈청의 높은 특이성 결합에 기여하는 것으로 규명하였다. N-말단 영역에서 두 개의 에피토프(tgc5 Pro II6G7= DSM ACC2778; tgc6 ProIII1G11= DSM ACC2779; tgc7 ProVII5C5= DSM ACC2780에 의해 인식됨) 외에, 도 14에서 보다 상세하게 도시된 4개의 추가적인 에피토프가 있다.

<58> 도 14: 인간 ANXA3 및 그의 항원성 영역(진한 보라색, 가장 낮은 부위의 선)의 서열에 관한 개요: 다중클론 AB1은 다른 아넥신 또는 다른 항원에 대해 교차-반응성을 갖지 않고, ANXA3에만 결합하는 높은 특이성의 다중클론 항혈청이다(2D-웨스턴 블롯 및 질량분석법에 의해 확인됨, 도 1). 다중클론 AB2는 에피토프 3 및 4에 대한 것이고; MAB1은 tgc7 ProVII5C5 = DSM ACC2780이고, MAB2는 tgc5 Pro II6G7 = DSM ACC2778 및 tgc6 ProIII1G11 = DSM ACC2779를 나타낸다; 재조합 ANXA3 단편 1-8이 개별적인 면역화를 위해 이용되었다.

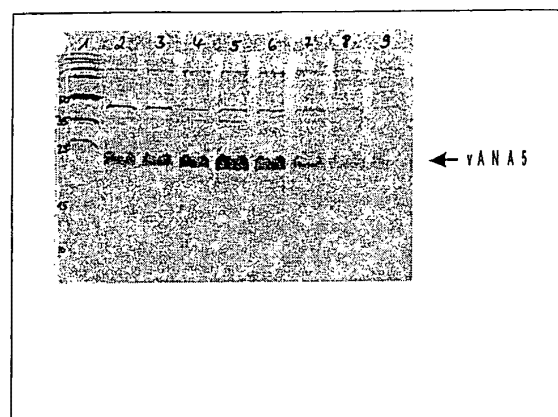
<59> 도 15: 인간 ANXA3의 결정 구조의 개략도.

도면

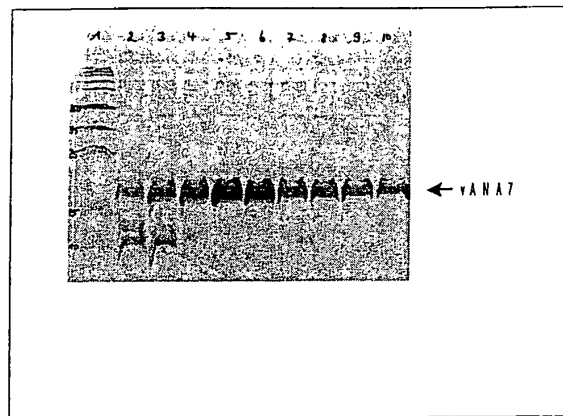
도면1



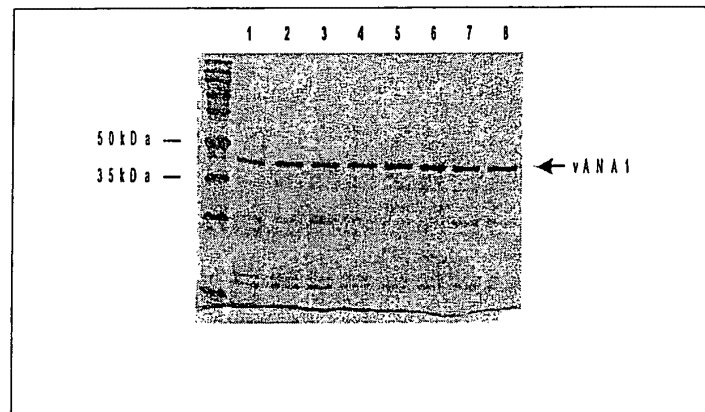
도면2



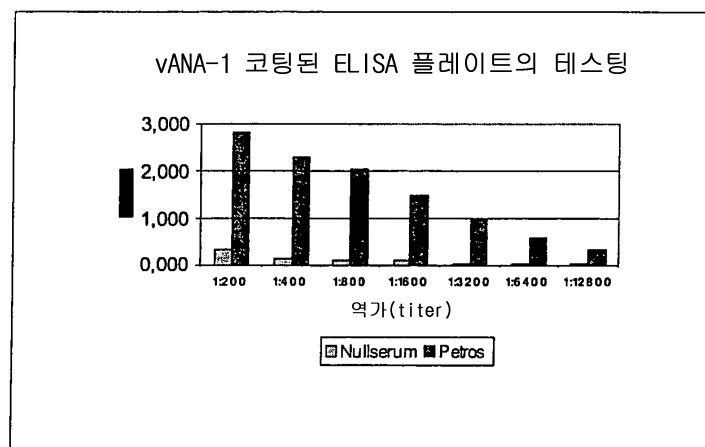
도면3



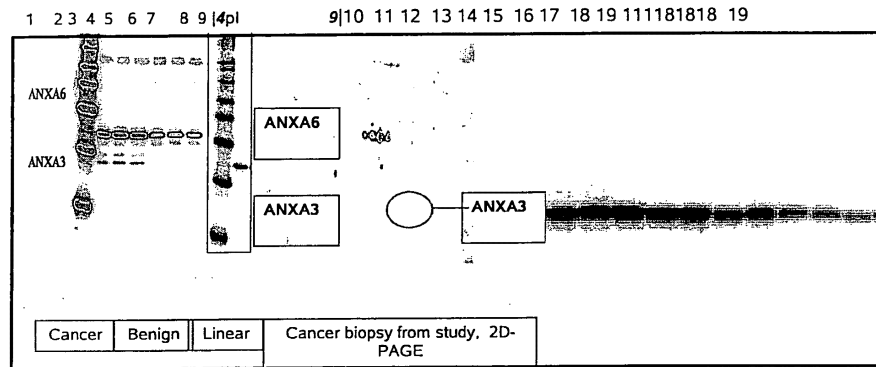
도면4



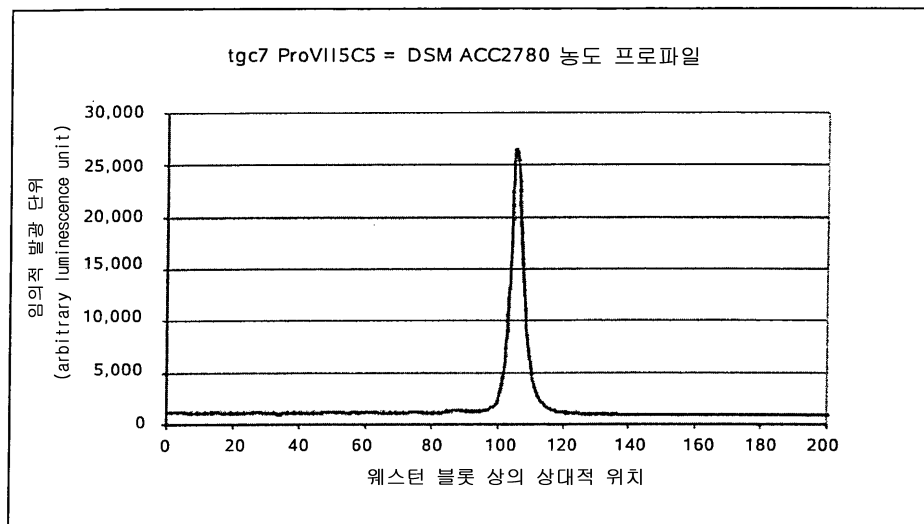
도면5



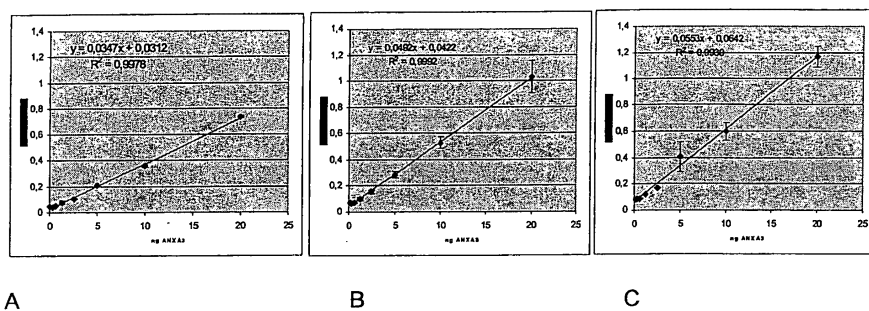
도면6



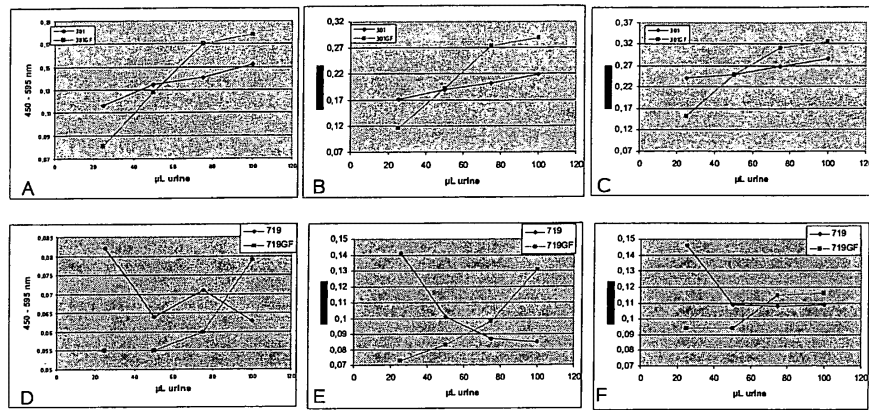
도면7



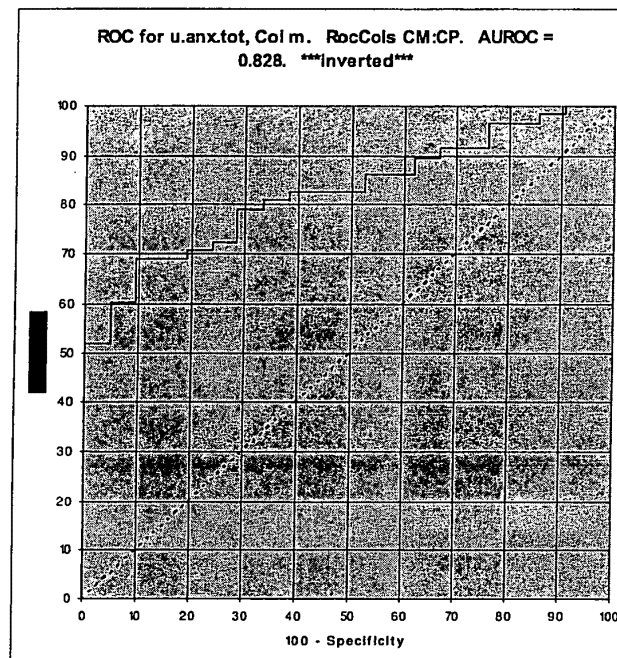
도면8



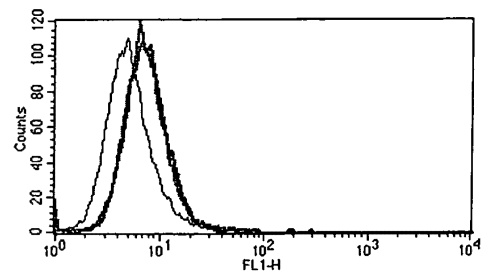
도면9



도면10

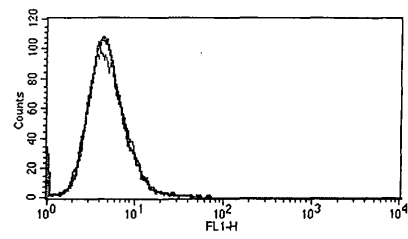


도면11

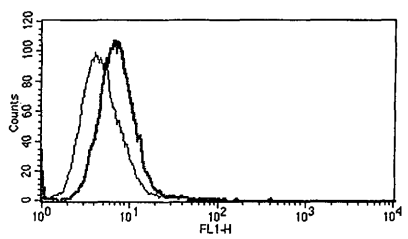


— 항-토끼 1:50
 — 대조구 혈청(토끼) 1:500
 — Petros 1:500 (Wozny et al, 2006)

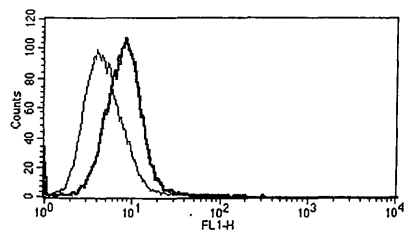
도면12



— 항-마우스 1:50
— 대조구 항체(마우스) 1:1

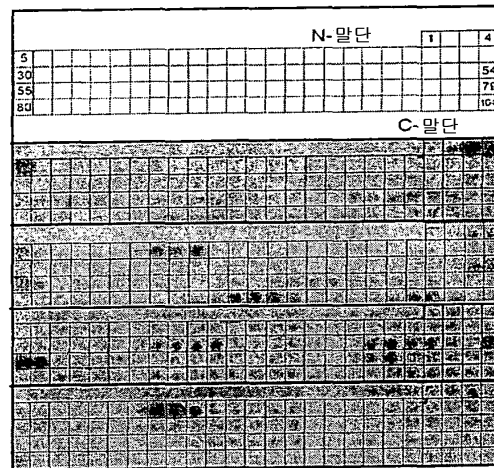


— 항-마우스 1:50
— tgc7ProVII5C5 5 μ g/ml

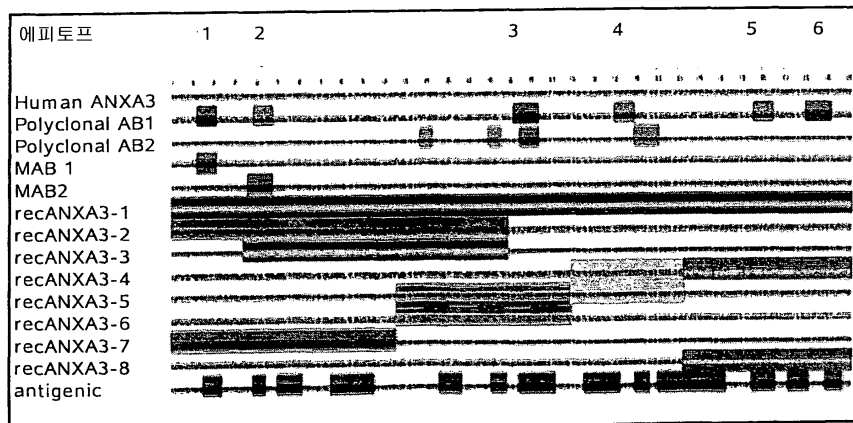


— 항-마우스 1:50
— tgc7ProVII5C5 20 μ g/ml

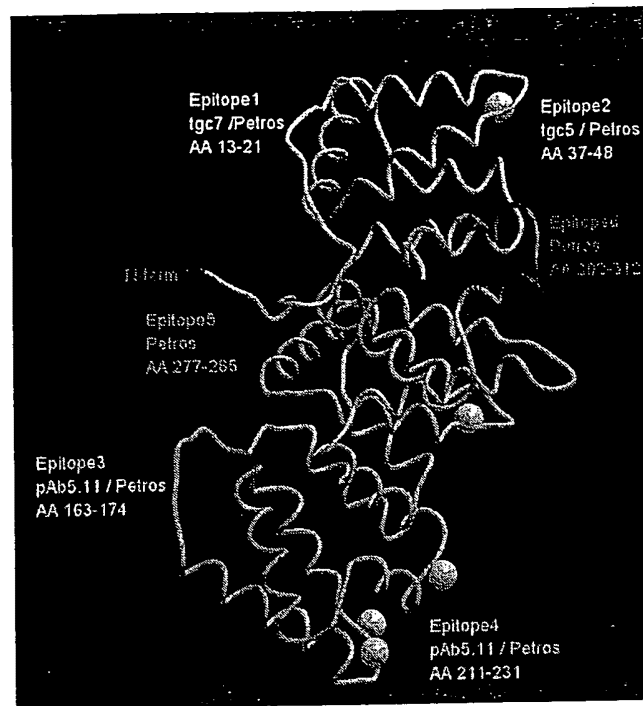
도면13



도면14



도면15



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> ProteoSys AG
- <120> Monoclonal anti-Annexin A3 antibodies for the detection of
prostate carcinoma
- <130> 38048P WO
- <140> PCT/EP 2007/005134
- <141> 2007-06-11
- <150> US 60/859,489
- <151> 2006-11-17
- <150> US 60/812,089
- <151> 2006-06-09
- <160> 6
- <170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Antibody

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(12)

<400> 1

Val	Arg	Asp	Tyr	Pro	Asp	Phe	Ser	Pro	Ser	Val	Asp
1				5				10			

<210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Antibody

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(12)

<400> 2

Met	Leu	Ile	Ser	Ile	Leu	Thr	Glu	Arg	Ser	Asn	Ala
1				5				10			

<210> 3
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> antibody

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(28)

<400> 3

Gly Asp Phe Arg Lys Ala Leu Leu Thr Leu Ala Asp Gly Arg Arg Asp
1 5 10 15

Glu Ser Leu Lys Val Asp Glu His Leu Ala Lys Gln
20 25

<210> 4

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> antibody

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(25)

<400> 4

Lys Leu Thr Phe Asp Glu Tyr Arg Asn Ile Ser Gln Lys Asp Ile Val
1 5 10 15

Asp Ser Ile Lys Gly Glu Leu Ser Gly
20 25

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> antibody

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(17)

<400> 5

Ile	Met	Val	Ser	Arg	Ser	Glu	Ile	Asp	Leu	Leu	Asp	Ile	Arg	Thr	Glu
1				5					10					15	

Phe

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> antibody

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(17)

<400> 6

Tyr	Ser	Ala	Ile	Lys	Ser	Asp	Thr	Ser	Gly	Asp	Tyr	Glu	Ile	Thr	Leu
1				5					10					15	

Leu